

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 48 417 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 48 417.4  
㉑ Anmeldetag: 29. 9. 2000  
㉒ Offenlegungstag: 11. 4. 2002

㉓ Int. Cl. 7:  
**G 01 N 33/50**  
G 01 N 33/52  
G 01 N 33/58  
G 01 N 33/53  
C 12 Q 1/68

㉔ Anmelder:  
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

㉕ Erfinder:  
Andres, Herbert, 82377 Penzberg, DE; Hoess, Eva,  
81476 München, DE; Josel, Hans-Peter, 82362  
Weilheim, DE; Herrmann, Rupert, 82362 Weilheim,  
DE; Eltz, Herbert von der, 82362 Weilheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉖ Verbindungen mit verzweigtem Linker  
㉗ Die vorliegende Erfindung betrifft neue Linker und deren Verwendung in diagnostischen Verfahren.

DE 100 48 417 A 1

DE 100 48 417 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Linker und deren Verwendung zur Herstellung von Konjugaten für den Einsatz in diagnostischen oder therapeutischen Verfahren.

5 [0002] In diagnostischen oder therapeutischen Verfahren werden oftmals Konjugate aus mehreren Bindegruppen oder/und Effektorgruppen, z. B. Markierungs- oder Festphasenbindegruppen oder Toxinen eingesetzt. Solche Konjugate können durch direkte Kopplung oder über aus dem Stand der Technik bekannte Brücken- oder Linkerstrukturen hergestellt werden. Von Nachteil für die Eigenschaften derartiger Konjugate sind oftmals störende intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Konjugationspartnern bzw. weiteren Komponenten.

10 [0003] Bei diagnostischen Tests führen diese unerwünschten intra- und intermolekularen Wechselwirkungen oft zur Verschlechterung wichtiger Parameter wie Signal-Dynamik, Signal-Rausch-Verhältnis, Breite des Meßbereichs, Leerwert, untere Nachweisgrenze und somit zu einer erheblichen Verschlechterung des Tests. Bei therapeutischen Verfahren führen die Wechselwirkungen wiederum zur Verringerung der Wirksamkeit bzw. der Targetspezifität.

15 [0004] Beispielsweise führt die Verwendung von Linkern, wie sie aus dem Stand der Technik für die Konjugation von lumineszierenden Metallkomplexen (EP-A-0 178 450, EP-A-0 580 979, WO 87/06706) bekannt sind, zu einer Verschlechterung der Test-Dynamik. Weitere Nachteile solcher Konjugate sind eine hohe unspezifische Bindung an Proteine und hohe Leerwerte.

[0005] Ähnliche Probleme treten jedoch auch bei anderen Markierungs- und Festphasenbindegruppen auf.

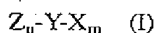
20 [0006] WO 96/03409 und WO 96/03410 offenbaren, dass durch die Einführung von freien positiven oder/und negativen Ladungsträgern in den Linker, der die reaktive kopplungsfähige Gruppe des Metallkomplexes mit einem der Liganden verbindet, bzw. die Einführung hydrophiler Gruppen in lumineszierende Metallkomplexe die unspezifische Adsorption von Konjugaten dieser Komplexe verringert und damit sowohl die Testsensitivität als auch die Stabilität und Wiederfindung der Konjugate in Immunoassays verbessert werden. Überdies kann fallweise eine erhöhte Quantenausbeute erzielt werden.

25 [0007] Bredehorst et al. (Anal. Biochem. 193 (1991), 272) beschreiben ein trifunktionelles Hapten-Fluorophor Konjugat, welches als Rückgrat die 21 Aminosäurereste des Insulin A-Kettenmoleküls enthält. Sofern es sich bei der Insulin A-Kette um einen Linker zwischen Fluoreszenz- und Haptengruppen handelt, ist dieser Linker ein linearer und kein verzweigter Linker.

30 [0008] In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Verwendung der hydrophilen oder geladenen Linker gemäß WO 96/03409 bzw. WO 96/03410 zu erheblichen Vorteilen in der Testperformance führt, dennoch liegt der Leerwert auch bei Verwendung solcher Komplexe noch deutlich über dem Leerwert des Systems. Daher wäre eine weitere Leerwertabsenkung durch Verringerung unspezifischer Bindungen wünschenswert. Zudem sollten unspezifische intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Markierungsgruppe und weiteren Testkomponenten verringert werden, ohne die Signalausbeute bzw. die Zugänglichkeit der Markierungsgruppe negativ zu beeinflussen.

35 [0009] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass durch Verwendung verzweigter Linker mit Ladungsträgern oder/und hydrophilen Gruppen insbesondere in den Seitenketten die genannten Nachteile beseitigt werden können. Diese verzweigten Linker bewirken Verbesserungen auch bei anderen in diagnostischen oder in therapeutischen Verfahren oder für Screening-Zwecke eingesetzten Arten von Konjugaten.

40 [0010] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung einer polyfunktionellen Verbindung der allgemeinen Formel (I):

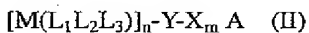


45 worin Z mindestens eine reaktive funktionelle Gruppe oder eine Bindegruppe bedeutet, X eine reaktive funktionelle Gruppe ist, die an Z kovalent über einen Linker Y gebunden ist, wobei der Linker ein verzweigter Linker ist, der ein Molekulargewicht von  $\geq 1000$  Da aufweist und mindestens einen Ladungsträger oder/und mindestens eine hydrophile Gruppe enthält, n eine ganze Zahl von 1 bis 10 und vorzugsweise von 1 bis 4 ist und m 1 oder 2 und vorzugsweise 1 ist, zur Herstellung von Konjugaten.

50 [0011] Die Gruppe Z kann einfach oder mehrfach vorkommen und kann jeweils unabhängig eine reaktive funktionelle Gruppe oder eine Bindegruppe sein. Beispiele für Bindegruppen sind Markierungsgruppen oder Effektorgruppen. Effektorgruppen sind z. B. Partner eines bioaffinen Bindepaares, die spezifische Wechselwirkungen mit dem jeweils anderen Partner des bioaffinen Bindepaares eingehen können.

55 [0012] Die Markierungsgruppen können aus beliebigen nachweisbaren bekannten Gruppen ausgewählt werden, beispielsweise aus Farbstoffen, Lumineszenz-Markierungsgruppen, wie etwa Chemilumineszenzgruppen, z. B. Acridiniumestern oder Dioxetanen, oder Fluoreszenzfarbstoffen, z. B. Fluorescein, Cumarin, Rhodamin, Oxazin, Resorufin, Cyanin und Derivaten davon. Weitere Beispiele für Markierungsgruppen sind lumineszierende Metallkomplexe wie Ruthenium- oder Europiumkomplexe, Enzyme wie für CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay, z. B. EP-A-0 061 888), Mikro- oder Nanopartikel, z. B. Latexpartikel oder Metallsole, und Radioisotope.

60 [0013] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Markierungsgruppe ein lumineszierender Metallkomplex und die Verbindung hat eine Struktur mit der allgemeinen Formel (II):



65 worin M ein zwei- oder dreiwertiges Metallkation ausgewählt aus Seltenerde- oder Übergangsmetallionen ist,  $L_1$ ,  $L_2$  und  $L_3$  gleich oder verschieden sind und Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei  $L_1$ ,  $L_2$  und  $L_3$  über Stickstoffatome an das Metallkation gebunden sind, X eine reaktive funktionelle Gruppe ist, die an mindestens einen der Liganden  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  kovalent über einen Linker Y gebunden ist, n eine ganze Zahl von 1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 4 ist, m 1 oder 2 und vorzugsweise 1 ist und A die gegebenenfalls zum Ladungsausgleich erforderlichen

Gegenionen bedeutet.

**[0014]** Der Metallkomplex ist vorzugsweise ein lumineszierender Metallkomplex, d. h. ein Metallkomplex, der nach entsprechender Anregung eine nachweisbare Lumineszenzreaktion zeigt. Der Nachweis dieser Lumineszenzreaktion kann beispielsweise durch Fluoreszenz- oder durch Elektrochemilumineszenzmessung erfolgen. Das Metallkation in diesem Komplex ist beispielsweise ein Übergangsmetall oder ein Seltenerdmetall. Vorzugsweise ist das Metall Ruthenium, Osmium, Rhenium, Iridium, Rhodium, Platin, Indium, Palladium, Molybdän, Technetium, Kupfer, Chrom oder Wolfram. Besonders bevorzugt sind Ruthenium, Iridium, Rhenium, Chrom und Osmium. Am meisten bevorzugt ist Ruthenium.

**[0015]** Die Liganden L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> und L<sub>3</sub> sind Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen. Bevorzugt sind aromatische Heterocyclen wie z. B. Bipyridyl, Bipyrazyl, Terpyridyl und Phenanthrolyl. Besonders bevorzugt werden die Liganden L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> und L<sub>3</sub> aus Bipyridin- und Phenanthrolin-Ringsystemen ausgewählt.

**[0016]** Weiterhin kann der Komplex gegebenenfalls ein oder mehrere zum Ladungsausgleich erforderliche Gegenionen A enthalten. Beispiele für geeignete negativ geladene Gegenionen sind Halogenide, OH<sup>-</sup>, Carbonat, Alkylcarboxylat, z. B. Trifluoracetat, Sulfat, Hexafluorophosphat- und Tetrafluoroborat-Gruppen. Hexafluorophosphat-, Trifluoracetat- und Tetrafluoroborat-Gruppen sind besonders bevorzugt. Beispiele für geeignete positiv geladene Gegenionen sind monovalente Kationen wie etwa Alkalimetall- und Ammoniumkationen.

**[0017]** Andererseits kann die Gruppe Z eine Effektorgruppe sein, die mit einem Bindepartner eine spezifische, vorzugsweise nicht kovalente Wechselwirkung eingehen kann. Beispiele für geeignete Bindepaare sind Hapten bzw. Antigen/Antikörper, Biotin bzw. Biotinanaloga wie etwa Aminobiotin, Iminobiotin oder Desthiobiotin/Avidin oder Streptavidin, Zucker/Lectin, Nukleinsäure bzw. Nukleinsäureanalogon/komplementäre Nukleinsäure, Rezeptor/Ligand z. B. Steroidhormonrezeptor/Steroidhormon, wobei ein Partner des Bindepaars die Effektorgruppe und somit Bestandteil der Verbindung (I) ist.

**[0018]** Z kann in einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung auch eine therapeutisch wirksame Substanz sein, z. B. ein Toxin oder ein Protoxin, z. B. eine antitumorwirksame Substanz.

**[0019]** Die Verbindungen (I) werden als Linkermoleküle zur Herstellung von Konjugaten verwendet. Dabei wird ein Bindepartner, insbesondere ein Bindepartner wie zuvor angegeben, kovalent mit der mindestens einen freien funktionellen Gruppe der Verbindung (I) gekoppelt. Das resultierende Kopplungsprodukt enthält mindestens zwei vorzugsweise unterschiedliche Bindepartner, die über den verzweigten Linker Y miteinander verknüpft sind.

**[0020]** Die reaktive funktionelle Gruppe X bzw. Z der Verbindung (I) bzw. des Komplexes (II) ist eine reaktive Gruppe, die kovalent mit einer biologischen Substanz gekoppelt werden kann. Vorzugsweise ist die Gruppe X eine aktivierte Carbonsäuregruppe wie etwa ein Carbonsäurehalogenid, ein Carbonsäureanhydrid, ein Carbonsäurehydrazid, ein Carbonsäureazid oder ein Aktivester, z. B. ein N-Hydroxysuccinimid-, ein p-Nitrophenyl-, Pentafluorphenyl-, Imidazolyl- oder N-Hydroxybenzotriazolylester, ein Amin, ein Maleimid, ein Thiol oder eine photoaktivierbare Gruppe, z. B. ein Azid. Die Verbindung kann eine oder mehrere funktionelle Gruppen X bzw. Z enthalten, die gleich oder verschieden sein können. Vorzugsweise sind X und Z verschieden. Wenn Z eine funktionelle Gruppe ist, kommt sie vorzugsweise nur einmal vor. Wenn Z eine Bindegruppe ist, kann sie auch mehrfach, z. B. bis zu 10mal vorkommen. Die funktionellen Gruppen oder Bindegruppen Z können jeweils gleich oder verschieden sein und gegebenenfalls durch Schutzgruppen blockiert sein. Die Gesamtzahl der Gruppen X plus Z beträgt jedoch mindestens 2, d. h. die Verbindung ist mindestens eine bifunktionelle Verbindung, vorzugsweise mindestens eine heterobifunktionelle Verbindung.

**[0021]** Das Molekulargewicht des Linkers beträgt mindestens 1000 Da, weil dann die Vorteile des Linkers besonders zu Tage treten. Vorzugsweise liegt das Molekulargewicht des Linkers im Bereich von 1000 bis 50.000 Da, besonders bevorzugt im Bereich von 1000 bis 20.000 Da und am meisten bevorzugt im Bereich von 1000 bis 10.000 Da.

**[0022]** Die Verbindung (I) bzw. der Metallkomplex (II) unterscheiden sich vom Stand der Technik dadurch, dass der Linker Y zwischen X und Z ein verzweigter Linker mit mindestens einem Ladungsträger oder/und mindestens einer hydrophilen Gruppe ist. Der Begriff "Ladungsträger" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Gruppe, die bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 überwiegend in ionischer Form vorliegt. Der Linker enthält vorzugsweise bis zu 70, besonders bevorzugt 1 bis 40 und am meisten bevorzugt 2 bis 20 solcher Ladungsträger.

**[0023]** Besonders bevorzugt enthält der Linker mindestens einen negativen Ladungsträger. Beispiele für geeignete negative Ladungsträger sind Phosphat-, Phosphonat-, Sulfonat-, Sulfonat-, Sulfat- und Carboxylatgruppen, wobei Carboxylatgruppen und Phosphatgruppen am meisten bevorzugt sind.

**[0024]** Beispiele für positive Ladungsträger sind Amino- und ein- oder mehrfach substituierte Aminogruppen, wie etwa Mono-, Di- oder Trialkylaminogruppen, wobei Alkyl einen geraden oder verzweigten Alkylrest von 1 bis 6 C-Atomen oder einen zyklischen Alkylrest von 3 bis 6 C-Atomen bedeutet. Besonders bevorzugt werden die positiven Ladungsträger aus basischen Aminosäuren wie etwa Lysin oder substituierten Aminosäuren wie etwa Diethyllysin ausgewählt. Amine und substituierte Amine können auch als Elektronendonoren beim Nachweis der Metallkomplexe durch Elektrochemilumineszenz dienen.

**[0025]** Alternativ oder zusätzlich zu den Ladungsträgern kann der Linker auch ungeladene hydrophile Gruppen enthalten. Bevorzugte Beispiele für ungeladene hydrophile Gruppen sind Ethylenoxid- oder Polyethylenoxidgruppen mit vorzugsweise mindestens drei Ethylenoxideinheiten, Sulfoxid-, Sulfon-, Carbonsäureamid-, Carbonsäureester-, Phosphonsäureamid-, Phosphonsäureester-, Phosphorsäureamid-, Phosphorsäureester-, Sulfonsäureamid-, Sulfonsäureester-, Schwefelsäureamid- und Schwefelsäureestergruppen. Die Amidgruppen sind vorzugsweise primäre Amidgruppen, besonders bevorzugt Carbonsäureamidreste in Aminosäureseitenketten z. B. der Aminosäuren Asparagin und Glutamin. Die Ester stammen vorzugsweise von hydrophilen Alkoholen, insbesondere C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> Alkoholen oder Di- bzw. Triolen.

**[0026]** Der Begriff "Verzweigung" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass der Linker eine Hauptkette zwischen den Gruppen Z und X und zusätzlich ausgehend von der Hauptkette eine oder mehrere Seitenketten enthält. Die Ladungsträger bzw. hydrophilen Gruppen können in der Haupt- oder/und in einer Seitenkette lokalisiert sein. Wenn der erfindungsgemäße Linker mehrere Gruppen Z bzw. X enthält, kann die Hauptkette als solche bereits verzweigt sein. Zusätzlich enthält der Linker jedoch auf jeden Fall eine oder mehrere Seitenketten, die keine der Gruppen Z und X ent-

halten. Die Anzahl der Seitenketten beträgt vorzugsweise 1 bis 10, besonders bevorzugt 2 bis 6 und am meisten bevorzugt 2 bis 4.

[0027] In einer bevorzugten Ausgestaltungsform der Erfindung enthält der Linker eine Hauptkette, die eine oder mehrere ungeladene hydrophile Gruppen wie zuvor angegeben, insbesondere Carbonsäureamidgruppen oder/und Polyethylenglykolfunktionen enthält, während sich mindestens ein Ladungsträger in einer oder mehreren Seitenketten befindet. Dabei können pro Seitenkette beispielsweise 1 bis 10 Ladungsträger und insbesondere 1 bis 5 Ladungsträger vorhanden sein. Alternativ kann der Linker auch Ladungsträger in der Hauptkette und ungeladene hydrophile Gruppen in einer oder mehreren Seitenketten enthalten. Außerdem sind auch solche Ausführungsformen denkbar, bei denen die Hauptkette und die Seitenketten sowohl ungeladene hydrophile Gruppen als auch Ladungsträger enthalten.

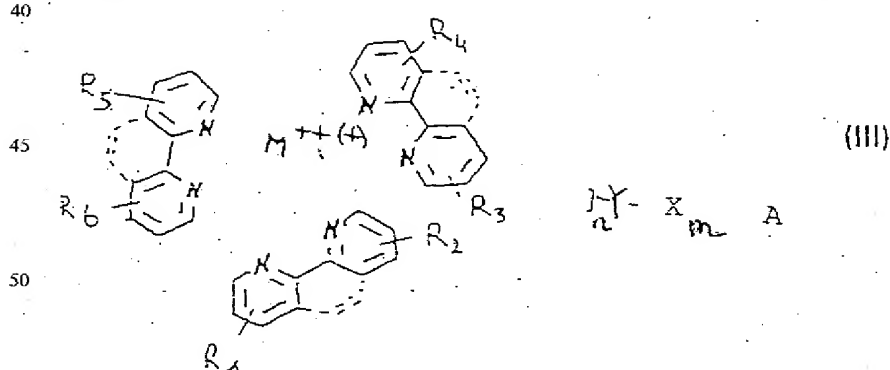
[0028] Der Linker hat eine Hauptkettenlänge von vorzugsweise 7 bis 200 Atomen, besonders bevorzugt 7 bis 100 Atomen, wobei die Hauptkette eine durch Einbau von Heteroatomen, z. B. O-Atomen oder Amidfunktionen modifizierte Alkylkette ist, die mindestens eine Verzweigung enthält, wobei die durch Verzweigungen gebildeten Seitenketten vorzugsweise eine Länge von 4 bis 100 Atomen aufweisen. Die Ladungsträger sind im Linker vorzugsweise derart angeordnet, dass ein H-Atom einer Alkyleneinheit der Hauptkette oder/und in einer Seitenkette durch eine einen Ladungsträger, z. B.  $\text{NH}_3^+$  oder  $\text{CO}_2^-$  enthaltende Gruppe ersetzt ist.

[0029] Vorzugsweise ist der verzweigte Linker, der die freien Ladungsträger oder/und hydrophilen Gruppen enthält, zumindest teilweise aus Aminocarbonsäure-Einheiten aufgebaut, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Bei einem derartigen Linker können die Verzweigungspunkte von polyfunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die insgesamt mindestens drei funktionelle Gruppen, z. B. Amino- oder Carboxylatgruppen enthalten, sodass nach Einbau in die Hauptkette noch eine funktionelle Gruppe vorhanden ist, die als Ausgangspunkt zum Aufbau der Seitenkette verwendet werden kann. Besonders bevorzugt werden die Verzweigungen mit Diaminocarbonsäuren, wie etwa Lysin, Ornithin, Hydroxylysin, etc. erzeugt.

[0030] Die Ladungsträger des verzweigten Linkers können aus freien positiv oder/und negativ geladenen Gruppen von polyfunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die insgesamt mindestens drei geladene Gruppen, z. B. Amino-, Carboxylat- oder Phosphatgruppen enthalten, so dass nach Einbau in den Linker und damit verbundener Reaktion von zwei der geladenen Gruppen noch mindestens ein freier Ladungsträger vorhanden ist. Beispielsweise können die Ladungsträger von trifunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die (a) eine Aminogruppe und zwei Carboxylatgruppen, oder (b) zwei Aminogruppen und eine Carboxylatgruppe enthalten. Beispiele für derartige trifunktionelle Aminocarbonsäuren sind Lysin, Ornithin, Hydroxylysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, symmetrische trifunktionelle Carbonsäuren wie sie in EP-A-0 618 192 bzw. US-A-5,519,142 beschrieben sind. Alternativ kann bei den trifunktionellen Aminocarbonsäuren (a) eine der Carboxylatgruppen durch eine Phosphat-, Sulfonat- oder Sulfatgruppe ersetzt sein. Ein Beispiel einer solcher trifunktionellen Aminosäure ist Phosphoserin.

[0031] Alternativ kann der verzweigte Linker auch mindestens teilweise aus Phosphat-Zucker-Einheiten, z. B. einem DNA-Rückgrat ohne Nukleobasen oder aus glykopeptidischen Strukturen aufgebaut sein. Darüber hinaus kann der Linker auch mindestens teilweise aus Saccharid-Einheiten bestehen. In jedem Fall liegt die Seitenkette des Linkers vorzugsweise an einer Verzweigung der Hauptkette, die durch eine trifunktionelle Einheit gebildet wird und die Länge einer Seitenkette beträgt mindestens zwei Synthesebausteine, z. B. natürliche oder synthetische Aminosäuren oder sonstige Bausteine wie Ethylenglykol.

[0032] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besitzt der Metallkomplex die allgemeine Formel (III):

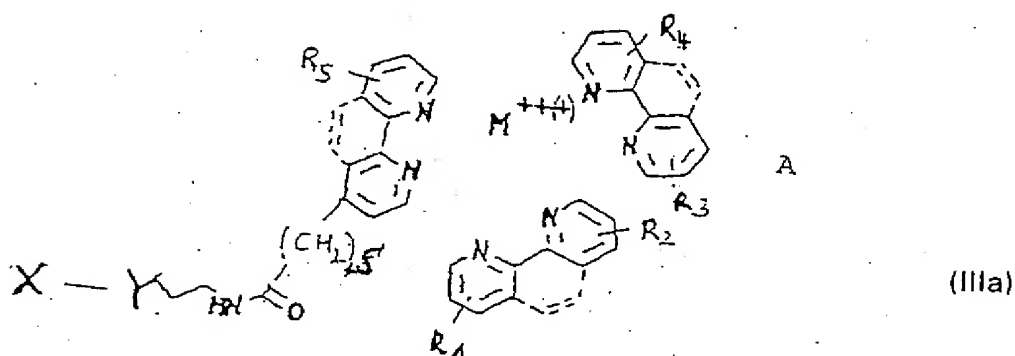


worin M, X, A, n und m wie vorstehend definiert sind,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  und  $R_6$  gleich oder verschieden sind und jeweils einen oder mehrere Substituenten bedeuten, unter der Voraussetzung, dass X über einen der Substituenten  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  oder  $R_6$  und den Linker Y an einen der Liganden gebunden ist.

[0033] Die Liganden des Komplexes sind je nach Anwesenheit bzw. Abwesenheit der durch gebrochene Linien bezeichneten Gruppen gegebenenfalls substituierte Phenanthrolin- bzw. Bipyridinsysteme.

[0034] Die Substituenten  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  und  $R_6$  an den Liganden sind – sofern sie nicht den Linker Y enthalten – vorzugsweise Wasserstoff,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_5$ -Alkyl, insbesondere  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ -Alkyl, Phenyl oder eine hydrophile Gruppe wie oben definiert.

[0035] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besitzen die Metallkomplexe die allgemeine Formel (IIIa):



worin M, X und A wie vorstehend definiert sind,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  und  $R_5$  wie vorstehend definiert sind, s eine ganze Zahl von 0 bis 6, vorzugsweise von 1 bis 4 ist und Y den verzweigten Linker mit freien Ladungsträgern oder/und hydrophilen Gruppen bedeutet.

[0036] Beispiele für Verbindungen der Formel (I) mit Metallkomplexen als Markierungsgruppen bzw. Biotin als Effektorgruppe und der Amino- oder Carboxylgruppe von Lysin als reaktiver funktioneller Gruppe sind in Abb. 1-7 dargestellt. Die Verzweigungsstellen des Linkers werden durch die trifunktionelle Aminosäure Lysin gebildet, die zwei Aminogruppen und eine Carboxylatgruppe aufweist. Eine Aminogruppe und eine Carboxylatgruppe dienen zur Ausbildung von Peptidbindungen in der Hauptkette des Linkers, während die zweite Aminogruppe als Ausgangspunkt zum Aufbau des Seitenarmes dient. Die freien Ladungsträger werden aus Glutaminsäureseitenketten gebildet. In Abb. 8 ist die Lysin-Aminogruppe durch Phenylacetyl (Phac) blockiert. Durch die Blockierung einer oder mehrerer reaktiver Gruppen im Linker durch Schutzgruppen, z. B. Phenylacetyl oder/und anderen mit der Gesamtstruktur kompatiblen Schutzgruppen, können auch labile Bindegruppen in die Verbindung (I) eingeführt werden.

[0037] Die reaktive Carboxylatgruppe kann beispielsweise durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid oder Disuccinimidylsuberat (DSS) in einen Aktivester überführt werden kann (siehe Abb. 12). Alternativ kann auch die primäre Aminogruppe durch Reaktion mit Maleimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimidester (MHS) in eine Maleimidgruppe überführt werden (siehe Abb. 9-11).

[0038] Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen ist im Folgenden am Beispiel von Metallkomplexen ausführlich beschrieben. Die Herstellung anderer Verbindungen, z. B. mit Biotin oder Peptidantigenen als Effektorgruppe, kann auf analoge Weise erfolgen.

[0039] Der Aufbau eines geladenen und verzweigten Linkers an einer Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe wie etwa dem N-heterocyclischen Liganden eines Metallkomplexes kann einerseits als Kopplungsreaktion in Lösung durchgeführt werden, wobei eine gegebenenfalls partiell geschützte Aminocarbonsäure an eine reaktive Gruppe des Liganden, z. B. eine Carbonsäure, gekoppelt wird. Dieser Kopplungsabschnitt kann gegebenenfalls nochmals wiederholt werden, bis ein verzweigter Linker mit der gewünschten Länge aufgebaut ist. Dabei wird mindestens eine polyfunktionelle Aminocarbonsäure eingeführt, die eine oder mehrere geladene Seitengruppen enthält.

[0040] Anschließend wird die reaktive Gruppe X eingeführt und gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen auf den Seitengruppen der Aminocarbonsäuren werden abgespalten. Dieser Aufbau des Liganden durch sukzessive Ankopplung von Aminosäuren in Lösung kann einerseits an einem einzelnen Liganden und andererseits an einem bereits an einen Metallkomplex gebundenen Liganden als Ausgangsmaterial erfolgen. Ein geeignetes Ausgangsmaterial ist z. B. ein lumineszierender Metallkomplex, der eine freie Carboxylatgruppe enthält. Derartige Komplexe sind aus den oben genannten Dokumenten bekannt und werden auch z. B. von der Firma Igen Inc., Rockville, MD, USA kommerziell angeboten.

[0041] Andererseits kann die Herstellung der Komplexe auch durch Festphasen-Peptidsynthese erfolgen. In einer ersten Ausführungsform der Festphasensynthese wird eine Aminosäure über ihre Carboxylatgruppe an den Festphasenträger gekoppelt und dann durch sukzessive Kopplung weiterer Aminosäuren der gewünschte Linker aufgebaut. Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Linkers wird dabei mindestens eine Aminosäure verwendet, die als Seitengruppe eine geladene Gruppe, z. B. eine Amino- oder eine Carboxylatgruppe und mindestens eine Aminosäure, die als Verzweigungsstelle dient, gegebenenfalls in geschützter Form enthält. Nach Fertigstellung der gewünschten Linkersequenz kann ein aktivierter Metallkomplex, z. B. als Aktivester, an die freie N-terminale Aminogruppe des festphasengebundenen Peptids gekoppelt werden. Nach Abspaltung von der Festphase kann die reaktive Gruppe X an den Carboxyterminus des Peptidlinkers gekoppelt und gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden.

[0042] In einer anderen Ausführungsform der Festphasensynthese kann ein Aminosäure-Metallkomplex-Konjugat, das eine geschützte Aminogruppe und eine Carboxylatgruppe enthält, z. B. Fmoc-Lys-(Ru(bipyridyl)<sub>3</sub>-OH) über die freie Carboxylatgruppe an eine Festphase verankert werden und nach Freisetzung der blockierten Aminogruppe ein Peptidlinker aufgebaut werden. Nach Fertigstellung der gewünschten Linkersequenz wird der Komplex von der Festphase abgespalten, wobei ein Linker erhalten wird, der zumindest die ursprüngliche Carboxylatankegruppe als freien Ladungsträger enthält. Die reaktive Gruppe X kann an den Aminoterminus des resultierenden Peptidlinkers gekoppelt werden.

[0043] In einer dritten Ausführungsform der Festphasensynthese kann die verzweigte Linkersequenz mit Ladungsträgern auch direkt an ein ausgewähltes Peptidepitop synthetisiert werden.

[0044] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann auch eine Kombination der oben genannten Syntheseverfahren erfolgen. Aminosäure-Metallkomplex-Konjugate, die zur Festphasensynthese der erfindungsgemäßen Komplexe mit geladenem Linker geeignet sind, werden in DE-A-44 30 998.8 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird

hiermit Bezug genommen.

[0045] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie zuvor definiert.

5 [0046] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Konjugat, umfassend mindestens eine biologische Substanz, an die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung (I) gekoppelt ist. Beispiele für geeignete biologische Substanzen sind Zellen, Viren, subzelluläre Teilchen, Proteine, Lipoproteine, Glycoproteine, Peptide, Polypeptide, Nukleinsäuren, peptidische Nukleinsäuren (PNA), Oligosaccharide, Polysaccharide, Lipopolysaccharide, zelluläre Metaboliten, Haptene, Hormone, pharmakologische Wirkstoffe, Alkaloide, Steroide, Vitamine, Aminosäuren und Zucker.

10 [0047] Die Kopplung der Verbindung mit der biologischen Substanz erfolgt über eine reaktive funktionelle Gruppe der Verbindung, die mit einer funktionellen Gruppe der biologischen Substanz kovalent kuppeln kann. Wenn die funktionelle Gruppe ein Aktivester ist, kann beispielsweise eine Kopplung mit freien Aminogruppen der biologischen Substanz erfolgen. Wenn die funktionelle Gruppe ein Malcimidrest ist, kann eine Kopplung mit freien SH-Gruppen der biologischen Substanz erfolgen.

15 [0048] Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Verbindungen an Peptide gekoppelt, die vorzugsweise eine Länge von maximal 50 Aminosäuren und besonders bevorzugt von maximal 30 Aminosäuren aufweisen. Die Herstellung dieser Peptide erfolgt vorzugsweise dadurch, dass man ein Peptid mit der gewünschten Aminosäuresequenz an einer Festphase synthetisiert, wobei man a) nach der Synthese eine Festphasenbindungs- oder/und Markierungsgruppe, z. B. einen aktivierten Metallkomplex, vorzugsweise ein Metallkomplex-Aktivsterderivat an die N-terminale Aminogruppe des Peptids koppelt oder/und b) während der Synthese an mindestens einer Position des Peptids ein Aminosäurederivat einführt, das kovalent mit einer Effektor- oder/und Markierungsgruppe, z. B. einem Hapten oder Metallkomplex gekoppelt ist. Die Kopplung der Effektor- oder/und Markierungsgruppe, z. B. an die N-terminale Aminosäure des Peptids, erfolgt vorzugsweise vor Abspaltung des Peptids von der Festphase und vor einer Abspaltung von Schutzgruppen an reaktiven Seitengruppen der zur Peptidsynthese verwendeten Aminosäurederivate.

25 [0049] Die Peptide enthalten vorzugsweise einen oder mehrere immunologisch reaktive Epitopbereiche. Diese Epitopbereiche stammen vorzugsweise aus pathogenen Organismen, z. B. Bakterien, Viren und Protozoen oder aus Autoimmun-Antigenen. Besonders bevorzugt stammt der Epitopbereich aus viralen Antigenen und korrespondiert zu den Aminosäuresequenzen von HIVI, HIVII, HIVO oder Hepatitis C-Virus (HCV).

30 [0050] Weitere bevorzugte Beispiele für biologische Substanzen sind Biotin, Toxine, Protoxine, Nukleinsäuren, Antikörper oder Antikörperfragmente, Polypeptidantigene, d. h. immunologisch reaktive Polypeptide oder Haptene, d. h. organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von 150 bis 2000, insbesondere Moleküle mit einem Steroidgrundgerüst, wie etwa Cardenolide, Cardenolid-Glycoside (z. B. Digoxin, Digoxigenin), Steroid-Alkaloide, Sexualhormone (z. B. Progesteron), Glucocorticoide etc. Weitere Beispiele für Haptene sind Prostaglandine, Leucotriene, Leucodiene, Thromboxane etc.

35 [0051] Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. der erfindungsgemäßen Konjugate in einem Nachweisverfahren, z. B. einem immunologischen Nachweisverfahren oder einem Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren, insbesondere in einem Lumineszenz-Assay.

40 [0052] Bei Verwendung eines Metallkomplexes als Markierungsgruppe erfolgt der Nachweis vorzugsweise durch Elektrochemilumineszenz, wobei lumineszierende Spezies elektrochemisch an der Oberfläche einer Elektrode erzeugt werden. Beispiele zur Durchführung von Lumineszenz-Assays mit Metallkomplexen des Standes der Technik finden sich in EP-A-0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 und WO 92/14138. Auf die dort offenbarten Verfahren und Vorrichtungen für Lumineszenz-Assays wird hiermit Bezug genommen. Die Elektrochemilumineszenz-Assays werden in Gegenwart einer Festphase durchgeführt, die vorzugsweise aus Mikropartikeln, insbesondere aus magnetischen Mikropartikeln besteht, die mit einer reaktiven Beschichtung versehen sind, z. B. mit Streptavidin. Auf diese Weise können Immun- oder Hybridisierungskomplexe, die einen Metallkomplex als Markierungsgruppe enthalten, an die Festphase gebunden nachgewiesen werden.

45 [0053] Die Elektrochemilumineszenz-Messung wird vorzugsweise in Gegenwart eines Reduktionsmittels für den Metallkomplex durchgeführt, z. B. einem Amin. bevorzugt sind aliphatische Amine, insbesondere primäre, sekundäre und tertiäre Alkylamine, deren Alkylgruppen jeweils 1 bis 3 Kohlenstoffatome aufweisen. Besonders bevorzugt ist Tripropylamin. Das Amin kann jedoch auch ein aromatisches Amin, wie Anilin oder ein heterocyclisches Amin sein. Das Reduktionsmittel kann bereits in der Ligandensphäre des Komplexes integriert sein.

50 [0054] Weiterhin kann gegebenenfalls als Verstärker ein oberflächenaktives Mittel, z. B. ein nicht-ionisches Mittel wie ein ethoxyliertes Phenol vorhanden sein. Derartige Substanzen sind beispielsweise kommerziell unter den Bezeichnungen Triton X100 oder Triton N401 erhältlich.

55 [0055] Andererseits kann der Nachweis des lumineszierenden Metallkomplexes auch durch Messung der Fluoreszenz oder der zeitaufgelösten Fluoreszenz erfolgen, wobei das Metallchelat durch Bestrahlung mit einem Licht der geeigneten Wellenlänge angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenzstrahlung gemessen wird. Beispiele zur Durchführung von Fluoreszenz-Assays finden sich in EP-A-0 178 450 und EP-A-0 255 534. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

60 [0056] Das zuvor ausführlich beschriebene Prinzip der Verwendung von Metallkomplexen mit verzweigten und geladenen bzw. hydrophilen Linkern kann in analoger Weise auf andere Markierungs- oder/und Effektorgruppen übertragen werden. Andere bevorzugte Testformate, bei denen die verzweigten Linker eingesetzt werden können, sind homogene Assays. Solche Assays basieren z. B. auf als CEDIA oder FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, vgl. z. B. Pope et al., Drug Discovery Today (1999), 350-362) wie zeitaufgelösten FRET bekannten Meßverfahren.

65 [0057] Durch Einsatz der erfindungsgemäßen verzweigten Linker können erhebliche Vorteile gegenüber bekannten Testformaten erreicht werden. So können positiv geladene lumineszierende Metallkomplexe durch negativ geladene Seitenarme besser abgeschirmt werden. Für hydrophobe Markierungsgruppen und biologische Substanzen wird durch Verwendung der verzweigten Linker generell eine bessere Solubilisierung und somit eine geringere unspezifische Bindung



gefunden. In vielen Fällen kann dies zu einer Erhöhung der Anzahl von Markierungsgruppen und somit zu höheren Signalausbeuten ausgenutzt werden. Die sterisch anspruchsvollen verzweigten Linker verhindern darüber hinaus das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Markierungsgruppen und hydrophoben biologischen Substanzen, sodass eine bessere Zugänglichkeit der Markierungsgruppe gewährleistet ist.

[0058] Durch die erfindungsgemäßen verzweigten Linker können bei diagnostischen Verfahren erhebliche Vorteile erreicht werden, beispielsweise Verringerung des Leerwerts, Verbesserung der Testdynamik, Erniedrigung der unteren Nachweisgrenze, Verbreiterung des Testbereichs oder/und Verringerung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Bei therapeutischen Anwendungen kann eine Verringerung der Wirkstoffdosis oder/und eine Verringerung von Nebenwirkungen erzielt werden.

[0059] Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass Linker, die einen oder mehrere Ladungsträger oder/und eine oder mehrere hydrophile Gruppen wie zuvor definiert tragen, eine große Verschiebung des apparenten Molekulargewichts in chromatographischen Methoden, wie Gelelektrophorese, z. B. Agarosegelelektrophorese, SDS-Gelelektrophorese, Gelfiltration, hydrophober Interaktionschromatographie und Ionenaustauscherchromatographie bewirken. Diese Wirkung tritt sowohl bei den in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen verzweigten Linkern als auch bei den in WO 96/03409 bzw. WO 96/03410 beschriebenen linearen Linkern ein. Aufgrund dieser Verschiebung des apparenten Molekulargewichts, d. h. die Linker scheinen ein höheres Molekulargewicht zu besitzen, als dies tatsächlich der Fall ist, können sie zur Herstellung von Konjugaten mit definierter Stöchiometrie und homogener Zusammensetzung eingesetzt werden. Nach Kopplung des Linkers, der z. B. eine definierte Anzahl von Markierungs- oder Effektorgruppen trägt, an eine Bindegruppe, z. B. ein Biomolekül, können durch chromatographische Methoden auf einfache Weise die Reaktionsprodukte des Ansatzes nach Stöchiometrie (z. B. ein Molekül Linker pro Bindegruppe, zwei Moleküle Linker pro Bindegruppe, drei Moleküle Linker pro Bindegruppe etc.) in Form von separaten Fraktionen erhalten werden.

[0060] Der zur Herstellung eines bestimmten Konjugats verwendete Linker soll dabei ein apparentes Molekulargewicht von vorzugsweise  $\geq 20\%$ , besonders bevorzugt  $\geq 30\%$  und am meisten bevorzugt  $\geq 40\%$  des apparenten Molekulargewichts der Bindegruppe im gleichen chromatographischen Trennsystem aufweisen.

[0061] Weiterhin werden Reagenzienkits (Linker plus Markierungs- bzw. Effektorgruppe(n) plus zu markierende Bindegruppe, z. B. Biomolekül), ein System (inklusive Meßvorrichtung zum Nachweis der jeweils vorhandenen Markierungsgruppe) sowie eine Zusammensetzung mit einem Reagenz definierter Stöchiometrie und Funktionalität bereit gestellt.

[0062] Ein bevorzugtes Beispiel für derartige Konjugate mit definierter Stöchiometrie sind monodigoxigenylierte Fab' Antikörperfragment-Konjugate.

[0063] Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch nachfolgende Beispiele und Abbildung erläutert. Es zeigen:

[0064] Abb. 1 bis 12 und 16 bis 20 erfindungsgemäße Verbindungen und

[0065] Abb. 13 bis 15 Aminosäuresequenzen von Vergleichsantigenen.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von verzweigten Linkern über Festphasen-Peptidsynthese

[0066] Die verzweigten Linker wurden mittels Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese an einem Batch-Peptidsynthesizer, z. B. von Applied Biosystems A433, hergestellt. Dazu wurden jeweils 4,0 Äquivalente der in Tabelle 1 dargestellten Aminosäurederivate verwendet.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



A	Fmoc-Ala-OH	
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	5
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	10
gE	Fmoc-Glu-OtBu	
F	Fmoc-Phe-OH	
G	Fmoc-Gly-OH	15
H	Fmoc-His(Trt)-OH	
I	Fmoc-Ile-OH	20
K1	Fmoc-Lys(Boc)-OH	
K2	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	25
K3	Fmoc-Lys(Dde)-OH	
K4	Fmoc-Lys(Alloc)-OH	
K5	Fmoc-Lys(PhAc)-OH	30
K6	Fmoc-Lys(Label)-OH	
K7	Boc-Lys(Fmoc)-OH	35
L	Fmoc-Leu-OH	
M	Fmoc-Met-OH	
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	40
P	Fmoc-Pro-OH	
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	45
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	50
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	
U	Fmoc- $\beta$ -Alanin-OH	
V	Fmoc-Val-OH	55
W	Fmoc-Trp-OH	
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	60
Z	Fmoc- $\epsilon$ -Aminocarbonsäure	
Ps	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	
Cs	Fmoc-Cys(SO <sub>3</sub> H)-OH	65

- [0067] Die Aminosäuren und Aminosäurederivate wurden in N-Methyl-pyrrolion gelöst. Das Peptid wird an Wang-Harz (S.-S. Wang (1973), J. Am. Chem. Soc., 95, 1328) aufgebaut. Die Harzbeladung liegt bei 0,2 bis 0,4 mMol/g. Die Kupplungsreaktionen wurden bezüglich des Fmoc-Aminosäurederivats mit 4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 4 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Reaktionsmedium während 20 min durchgeführt.
- 5 Nach jedem Syntheseschritt wurde die Fmoc-Gruppe mit 20%-igem Piperidin in Dimethylformamid in 20 min abgespalten. Die Harzmenge wurde so gewählt, dass nach der letzten Verzweigung 4 Äquivalente Fmoc-Aminosäure bezogen auf die Aminogruppen eingesetzt werden. Für die Verzweigung und anschließende Synthese von zwei gleichen Armen wird Fmoc-Lys(Fmoc)-OH verwendet. Die unsymmetrischen Verzweigungen werden über Aminosäurederivate mit orthogonalen Seitenkettenschutzgruppen wie Fmoc-Lys(Dde) oder Fmoc-Lys(Alloc) erzielt. Die Abspaltung dieser orthogonalen Schutzgruppen erfolgt nach den in der Literatur bekannten Methoden am Harz (B. W. Bycroft et al. (1993) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 778; A. Merzouk et al. (1992) Tetrahedron Lett. 33, 477). Gegebenenfalls würden endständige Aminogruppen an der Festphase mit Essigsäureanhydrid oder Bernsteinsäureanhydrid acetyliert oder succinyliert.
- 10 [0068] Die Einführung des Haptens, Labels oder der funktionellen Gruppe erfolgte, wenn das Derivat stabil ist während der Festphasensynthese, bereits am Harz z. B. an der N-terminalen Aminosäure des Peptids.
- [0069] Die Einführung z. B. einer Metallchelate-Markierung erfolgte über entsprechende Aktivester-Derivate an die freien N-terminale Aminogruppe des trägergebundenen Peptids. Hierzu wurden vier Äquivalente Ruthenium(bipyridyl)<sub>3</sub>-Komplex (BPRu) pro freie primäre Aminofunktion aktiviert mit N-Hydroxybenzotriazol/Dicyclohexylcarbodiimid und in wenig DMSO gelöst, zugetropft und bei Raumtemperatur ca. 2 h gerührt.
- 15 [0070] Die Einführung kann aber auch C-terminal bereits während der Festphasensynthese durch den direkten Einbau von z. B. Metallchelate oder Biotin-gekoppelten Aminosäurederivaten erfolgen (beschrieben in WO 96/03409).
- [0071] Die Freisetzung des Peptids vom Träger und die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgte mit 20 ml Trifluoressigsäure, 0,5 ml Ethandithiol, 1 ml Thioanisol, 1,5 g Phenol und 1 ml Wasser in 40 min bei Raumtemperatur. Je nach den verwendeten Aminosäurederivaten können auch Cocktails mit weniger Radikalfänger eingesetzt werden. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 300 ml gekühltem Diisopropylether versetzt und zur vollständigen Fällung des
- 25 Peptids 40 min bei 0°C gehalten. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Diisopropylether nachgewaschen, mit wenig 50%-iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Das erhaltene Rohmaterial wurde mittels präparativer HPLC an Delta-PAK RP C18 Material (Säule 50 × 300 mm, 100 Å; 15 µ) über einen entsprechenden Gradienten (Eluent A: Wasser, 0,1% Trifluoressigsäure, Eluent B: Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) in ca. 120 min aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt.
- 30 [0072] Beispiele für solche, durch Festphasensynthese hergestellte Verbindungen, sind in den Abb. 1 bis 7 und 16 gezeigt.
- [0073] Alternativ kann die Markierungsgruppe (Label), die Effektorgruppe (Hapten) oder die funktionelle Gruppe auch nach der Abspaltung vom Harz eingeführt werden. Hierzu sind evtl. weitere Aminogruppen, die nicht derivatisiert werden sollen, mit einer Schutzgruppe zu blockieren, die sowohl während der Festphasenpeptidsynthese als auch der
- 35 Abspaltung stabil ist (z. B. Phenylacetyl (Phac). Die Schutzgruppe kann enzymatisch mit PenG-Amidase entfernt werden (beschrieben in PCT/EP95/02921).
- [0074] Ein Beispiel für eine mit Phac geschützte Verbindung ist in Abb. 8 gezeigt.

## Beispiel 2

## Einführung der Maleinimidfunktion in verzweigte peptidische Linker

- [0075] Zur Einführung der Maleinimidfunktion wurde ein Peptid gemäß Beispiel 1 in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst und mit einem Äquivalent Maleinimidhexansäure-N-hydroxysuccinimidester (MH = Maleinimidohexanoyl) in DMSO versetzt und 16 h bei 25°C gerührt. Der Ansatz wurde über präparative HPLC (s. o.) aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wurde mittels Massenspektrometrie geprüft.
- 45 [0076] Es wurden die in Abb. 9 bis 11 und 17 gezeigten Verbindungen hergestellt.

## Beispiel 3

## Einführung von N-Hydroxysuccinimidestergruppen in verzweigte peptidische Linker

- [0077] Die experimentelle Durchführung erfolgte analog WO 96/03409, Beispiel 6.
- 55 [0078] Es wurde die in Abb. 12 gezeigte Verbindung hergestellt.

## Beispiel 4

- [0079] Anwendung von Metallkomplex-Antigen-Konjugaten mit verzweigten und geladenen Linkern in immunologischen Tests.
- 60 [0080] Es wurde ein Doppel-Antigen-Brückentest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen HIV durchgeführt. Hierbei wurde die Probenflüssigkeit mit einem Ruthenium-markierten Antigen und einem biotinylierten Antigen für den zu bestimmenden Antikörper in Gegenwart einer Streptavidinbeschichteten Festphase inkubiert. Das Vorhandensein von Anti-HIV-Antikörpern in der Probenflüssigkeit wurde durch Bestimmung der Markierung an der Festphase mittels Elektrolumineszenz nach dem Elecsys®-System bestimmt.
- 65 [0081] Als Antigen wurde ein HIV-Peptid aus dem gp36-Bereich von HIV 2 verwendet, das am N-Terminus mit einem SH-funktionellen Linker verlängert wurde (Abb. 13). Die Herstellung derartiger Antigene ist in WO 96/03652 beschrieben.
- [0082] Zur Derivatisierung des HIV-Peptids mit Maleinimido-aktivierten Rutheniumkomplexen wurde das HIV-Peptid

mit der reaktiven Mercaptofunktion an Maleinimido-aktivierte Rutheniumlinker in 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7 innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur konjugiert. Nicht umgesetzte Bestandteile wurden entweder mittels präparativer HPLC oder Gelchromatographie abgetrennt. Die gereinigten Produkte wurden lyophilisiert.

Verbindung A: BPRu-Linker aus Abb. 9 mit gp36-Antigen

Verbindung B: BPRu-Linker aus Abb. 10 mit gp36-Antigen

Verbindung C: BPRu-Linker aus Abb. 11 mit gp36-Antigen

Verbindung D: BPRu-Linker aus Abb. 17 mit gp36-Antigen

[0083] Es wurden gp36-Konjugate mit verschiedenen Linkervarianten (Verbindungen A-D) hergestellt und im oben beschriebenen Testformat bewertet. Alle Bewertungen wurden mit dem gleichen biotinylierten gp36-Peptid (Abb. 14) und in gleicher Konzentration durchgeführt. Markierte Detektionsantigene wurden in äquimolarer Konzentration zum biotinylierten Fängerantigen eingesetzt.

[0084] Als markiertes Vergleichsantigen gemäß Stand der Technik wurde auf der Detektionsseite das Konjugat gemäß Abb. 15 beschrieben in PCT/EP95/02921 verwendet.

[0085] Die erfindungsgemäßen Antigene wurden äquimolar bezogen auf das Antigen des Standes der Technik eingesetzt. Die Konzentration betrug 0,018 nmol/l.

[0086] In Tabelle 2 ist das Ergebnis der Experimente mit den Konjugaten A und C im Vergleich zur Verbindung aus Abb. 15 in ECL-Counts dargestellt. Es ist ersichtlich, dass erst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Linker deutlich niedrigere Leerwerte bei gleichbleibenden Positivsignalen und damit verbunden eine bessere Differenzierung von Positivsignal/Negativsignal ergeben. Diese verbesserten Signal/Rausch-Verhältnisse führen zu einer Verbesserung des Meßbereichs.

Tabelle 2

Experiment	Vergleich	A	C
Negative Probe	6014	2044	1975
Positive Probe	345247	484681	391007
Verhältnis positiv/negativ	57,5	237,1	198

[0087] In Tabelle 3 ist das Ergebnis aus dem Experiment mit Konjugat B im Vergleich zur Verbindung Abb. 15 in ECL-Counts dargestellt. Es ist ersichtlich, dass durch die Abschirmung über die verzweigten Linker auch mehrere Label eingeführt werden können, ohne dass der Leerwert signifikant ansteigt. Überraschenderweise wird auch das positive Signal nicht gequenchet, sondern sogar eine Erhöhung der gemessenen Counts beobachtet.

Tabelle 3

Experiment	Vergleich	B
Negative Probe	6096	2366
Positive Probe	393197	765298
Verhältnis positiv/negativ	64,5	323,5

[0088] In Tabelle 4 ist das Ergebnis aus dem Experiment mit Konjugat D im Vergleich zur Verbindung gemäß Abb. 15 in ECL-Counts dargestellt. Überraschender Weise haben auch ungeladene Linker einen positiven Einfluß auf den Leerwert.

Tabelle 4

Experiment	Vergleich	D
Negative Probe	6718	2015
Positive Probe	553816	759947
Verhältnis positiv/negativ	82,4	377,1

## Beispiel 5

## Herstellung von Antikörperfragment-Konjugaten

## 1. Beschreibung des Verfahrens

## Herstellung des Fab' aus IgG

**[0089]** Ein monoklonaler-Anti-Dig-Antikörper wurde mittels Pepsin zu  $F(ab')_2$  gespalten. Nach quantitativer Spaltung wurde das Pepsin durch pH-Wert-Erhöhung und Pepstatin inaktiviert. Ohne vorherige Aufreinigung wurde mittels Cysteamin das  $F(ab')_2$  zu Fab' reduziert. Cysteamin spaltet nahezu selektiv die Disulfidbrücken in der Hinge-Region. Anschließend wurde dialysiert. Hierbei wurden die durch Pepsin erzeugten Fc-Spaltprodukte größtenteils entfernt, da sie klein genug sind, die Poren des Dialyseschlauches ( $> 10000$  Dalton) zu passieren.

## Fab'-BPRu-Linker-Konjugat

**[0090]** Die Konjugatsynthese erfolgte, indem man das Fab' mit einem Überschuß von BPRu-Linker-MH umsetzt. Hierbei wurde überwiegend eine SH-Gruppe in der Hinge-Region umgesetzt. Als Nebenreaktion entstanden kleine Mengen von mehrfachruthenylierten Fab' via reduzierten intramolekularen Disulfid-Brücken in der leichten und der Fd-Kette.

## Reinigung des Rohkonjugates

**[0091]** Das Rohkonjugat wurde mittels Molekularsieb gereinigt. Hierbei wurde das monoruthenylierte vom mehrfachruthenylierten Material abgetrennt.

## 2. Durchführung

Spaltung des Antikörpers zu  $F(ab')_2$ 

**[0092]** Das Lyophilisat des monoklonalen Antikörpers Anti-Dig-M 19.11-IgG wurde mit  $H_2O$  rekonstituiert, so dass die Konzentration 20 mg/ml betrug. Pro ml Lösung wurden 20  $\mu$ l 1 M Citrat pH 3.5 zugegeben (Endkonzentration Citrat = 20 mM). Der pH wurde mit HCl auf 3.60 eingestellt. Es wurde durch ein 0.45  $\mu$ m Filter filtriert. Bei OD 280 nm wurde die Konzentration bestimmt (1 OD<sub>280nm</sub> = 1.4 mg/ml). Mit 20 mM Citrat pH 3.60 wurde auf 10 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Pro ml Antikörperlösung wurden 100  $\mu$ l Pepsinlösung (3 mg/ml) zugegeben und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach vollständiger Spaltung wurde die Reaktion gestoppt durch Erhöhung des pH-Wertes und Zugabe von Pepstatin.

## Reduktion zu Fab'

**[0093]** Pro ml Spaltansatz wurden 52.6  $\mu$ l 0.1 M Dithiothreitol (DTT) zugegeben und 30 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Das Fab' wurde dialysiert gegen 0.1 M  $NaH_2PO_4/NaOH$  pH 6.5, 30 mM NaCl, 2 mM EDTA.

## Synthese des Fab'-BPRu-Linker-Konjugats

**[0094]** Der BPRu-Linker-MH wurde in DMSO gelöst. Die Stöchiometrie Fab':BPRu-Linker-MH war 1 : 3 (mol/mol). Die Endkonzentration Fab' im Ansatz betrug 3.9 mg/ml. Die DMSO-Konzentration im Ansatz betrug maximal 10%. Die Reaktionszeit war 1 Std. bei Raumtemperatur.

## Reinigung

**[0095]** Das Rohkonjugat wurde mit AMICON PM 10 um den Faktor 2-3 einkonzentriert und mittels Superdex 200 gereinigt (Puffer: 25 mM MOPS/NaOH pH 6.5, 50 mM NaCl, 10% DMSO; Auftrag: max 1.5% des Gelbettes; Fraktionen: 0.5% vom Gelbett). Die Fraktionen, welche das Fab'-BPRu-Linker-Konjugat enthalten, wurden gepoolt.

## Beispiel 6

Anwendung von Metallkomplex-Antikörperfragment-Konjugaten mit verzweigten und geladenen Linkern in immunologischen Tests

[0096] Es wurde ein Doppel-Antigen-Brückentest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen HIV durchgeführt. Hierbei wurde die Probenflüssigkeit mit einem biotinylierten Antigen und einem Digoxigenin-markierten Antigen gegen den zu bestimmenden Antikörper in Gegenwart einer Streptavidinbeschichteten Festphase und Anti-Dig-BPRu-Antikörper inkubiert. Das Vorhandensein von Anti-HIV-Antikörpern in der Probeflüssigkeit wurde durch Bestimmung der Markierung an der Festphase durch Elektrochemilumineszenz nach dem Elecsys®-System bestimmt.

[0097] Als Antigen wurde ein HIV-Peptid aus dem gp41-Bereich von HIV1 verwendet, das am N-Terminus markiert ist. Die Herstellung der digoxigenylierten Antigene ist in PCT/EP95/02921 beschrieben.

[0098] Zur Detektion wurden verschiedene Dig-BPRu-Konjugate eingesetzt:

Verbindung E: Anti-Dig-IgG-BPRu ohne Linker

Verbindung F: Anti-Dig-Fab'-BPRu mit Linker aus Abb. 9

[0099] Alle Antigene wurden äquimolar bezogen auf das Antigen eingesetzt. Die Konzentration an Antigen betrug 20 ng/ml.

[0100] In Tabelle 5 ist das Ergebnis der Experimente mit Verbindung E im Vergleich zu Verbindung F dargestellt. Digoxigenyliertes Antigen und Antikörperkonjugat (Konzentration 180 ng/ml) wurden vorinkubiert. Es ist ersichtlich, dass durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Linker deutlich niedrigere Leerwerte und damit verbunden eine bessere Differenzierung von Positiv/Negativsignal resultiert.

Tabelle 5

Experiment [counts]	Ohne BPRu-Konju. = Systemleerwert	Verbindung E	Verbindung F
Negative Probe	441	2117	582
Positive Probe 1	437	1215275	668410
Positive Probe 2	453	49187	25819

Experiment Pos./neg. Seren	Ohne BPRu-Konju. = Systemleerwert	Verbindung E	Verbindung F
Negative Probe	1,0	1,0	1,0
Positive Probe 1	0,99	574,1	1148,5
Positive Probe 2	1,03	23,1	44,4

[0101] In Tabelle 6 wurde die Testführung dahingehend geändert, dass vor der Zugabe des Antikörperkonjugats (Konzentration 600 ng/ml) die Magnet-Beads mit daran gebundenen Immunkomplexen nochmals gewaschen wurde. Auch hier zeigen sich deutlich niedrigere Leerwerte und damit verbunden eine bessere Differenzierung.

Tabelle 6

Experiment [counts]	Ohne BPRu-Konju. = Systemleerwert	Verbin- dung E	Verbin- dung F
Negative Probe	464	2771	758
Positive Probe 1	453	1503690	686607
Positive Probe 2	480	47040	27133

Experiment Pos./neg. Seren	Ohne BPRu-Konju. = Systemleerwert	Verbin- dung E	Verbin- dung F
Negative Probe	1,0	1,0	1,0
Positive Probe 1	0,98	592,6	905,8
Positive Probe 2	1,03	17,0	35,8

[0102] Tabelle 7 zeigt die unspezifische Bindung des Antikörper-Konjugats an die Streptavidin-Festphase. Bei dieser Testführung werden anstatt der biotinylierten und digoxigenylierten Antigene nur der Puffer eingesetzt. Die Konzentration des Antikörper-Konjugats beträgt 600 ng/ml. Der erfindungsgemäße Linker zeigt auch hier die besseren Leerwerte.

Experiment [counts]	Ohne BPRu-Konju. = Systemleerwert	Verbin- dung E	Verbin- dung F
Negative Probe	333	3188	566
Puffer	329	983	436

## Beispiel 7

## Herstellung weiterer Konjugate

## 1. Synthese eines Testosteron-Derivates (Abb. 18)

[0103] 8,5 mg BPRu-Linker-NH<sub>2</sub> wurden in ca. 2 ml Phosphat-Puffer pH 8,5 gelöst und dazu 1,8 mg des aktivierten Testosteron-Derivates (Testosteron-3-dimethylcarboxyoxim-NHS) gelöst in 2 ml Dioxan getropft. Man läßt 6 h bei Raumtemp. unter Lichtausschluß rühren.

[0104] Das Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Das Molekulargewicht wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI) mit 3180 bestätigt.

## 2. Synthese eines T 3 Derivates (Abb. 19)

[0105] Die Synthese erfolgt in Analogie zu 1. MS-MALDI entspricht dem erwarteten Molekulargewicht.

## 3. Synthese eines PEG-Lys-MP-gp32-Derivates (Abb. 20)

[0106] Ausgehend vom Ruthenium-Komplex-Lysin-Derivat erfolgte im ersten Schritt die Umsetzung der freien  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins nach üblichen Methoden mit Maleinimidopropionsäure(MP)-NHS-ester. Dann erfolgte die Aktivierung der Carbonsäure nach Standardmethoden.

[0107] Im nächsten Schritt wurden 3,64 mg des Aktivesters mit 25,5 mg eines aminomodifizierten Polyethylenglykols H<sub>2</sub>N-PEG-OCH<sub>3</sub>-5000 (Shearwater) in 20 ml Acetonitril bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Produktgemisch wurde einrotiert und mittels Gelchromatographie aufgereinigt (MALDI entspricht dem erwarteten Molekulargewicht).

[0108] Die weitere Kopplung des Maleinimids an gp-32 erfolgte analog den bereits beschriebenen Verfahren. Das mit Massenspektrometrie ermittelte Molekulargewicht entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von 6990.

1. Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I)  
 $Z_n-Y-X_m$  (I)  
 worin Z mindestens eine reaktive funktionelle Gruppe oder eine Bindegruppe bedeutet und, X mindestens eine reaktive funktionelle Gruppe ist, die an Z kovalent über einen Linker Y gebunden ist, wobei der Linker ein verzweigter Linker ist, der ein Molekulargewicht von  $\geq 1000$  Da aufweist und mindestens einen Ladungsträger oder/und mindestens eine hydrophile Gruppe enthält, n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und m 1 oder 2 ist, zur Herstellung von Konjugaten. 5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindegruppe eine Markierungsgruppe oder eine Effektorgruppe ist. 10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindegruppe eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Lumineszenz- und Fluoreszenznachweisgruppen, Enzymen, Mikro- oder Nanopartikeln und Radioisotopen ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungsgruppe eine Verbindung der allgemeinen Formel (II) ist: 15  
 $[M(L_1L_2L_3)]_n-Y-X_m$  A (II)  
 worin  
 M ein zwei- oder dreiwertiges Metallkation ausgewählt aus Seltenerde- oder Übergangsmetallionen ist,  
 L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> und L<sub>3</sub> gleich oder verschieden sind und Liganden mit mindestens zwei stickstoffhaltigen Heterocyclen bedeuten, wobei L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> und L<sub>3</sub> über Stickstoffatome an das Metallkation gebunden sind, 20  
 X eine reaktive funktionelle Gruppe ist, die an mindestens einen der Liganden L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> kovalent über den verzweigten Linker Y gebunden ist,  
 n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist,  
 m 1 oder 2 ist und 25  
 A die gegebenenfalls zum Ladungsausgleich erforderlichen Gegenionen bedeutet.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindegruppe eine Effektorgruppe, ausgewählt aus Partnern spezifischer bioaffiner Bindepaare ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Effektorgruppe ausgewählt ist aus Biotin und Analoga davon, Streptavidin, Avidin, Antigenen, Haptenen, Antikörpern, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Zuckern, Lectinen, Rezeptoren und Rezeptorliganden. 30
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive funktionelle Gruppe eine Carbonsäure, ein Carbonsäurehalogenid, ein Carbonsäureanhydrid, ein Carbonsäurehydrazid, ein Carbonsäureazid, ein Amin, ein Aktivester, ein Maleimid, ein Thiol oder eine photoaktivierbare Gruppe ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker mindestens einen negativen Ladungsträger, ausgewählt aus Phosphat-, Phosphonat-, Sulfinat-, Sulfonat-, Sulfat- und Carboxylatgruppen enthält. 35
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker mindestens eine Carboxylat- oder/und Phosphatgruppe enthält.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker mindestens einen positiven Ladungsträger, ausgewählt aus Amino- und substituierten Aminogruppen enthält. 40
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker bis zu 70 Ladungsträger enthält.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker 1 bis 40 Ladungsträger enthält. 45
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker mindestens eine ungeladene hydrophile Gruppe, ausgewählt aus Ethylenoxid-, Polyethylenoxid-, Sulfoxid-, Sulfon-, Carbonsäureamid-, Carbonsäureester, Phosphonsäureamid-, Phosphonsäureester-, Phosphorsäureamid-, Phosphorsäureester-, Sulfonsäureamid-, Sulfonsäureester-, Schwefelsäureamid- und Schwefelsäureestergruppen enthält.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine ungeladene hydrophile Gruppe eine primäre Carbonsäureamidgruppe ist. 50
15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Molekulargewicht des Linkers im Bereich von 1000 bis 50.000 Da liegt.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der verzweigte Linker zumindest teilweise aus Aminocarbonsäure-Einheiten aufgebaut ist, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. 55
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Ladungsträger von polyfunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die nach Einbau in den Linker noch mindestens einen freien Ladungsträger enthalten.
18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophilen Gruppen von polyfunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die nach Einbau in den Linker noch mindestens eine hydrophile Gruppe enthalten. 60
19. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Verzweigungsstellen von polyfunktionellen Aminocarbonsäuren stammen, die nach Einbau in den Linker noch mindestens eine freie Funktionalität enthalten, die zum Aufbau einer Seitenkette dient.
20. Verwendung nach Anspruch 17, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass die polyfunktionellen Aminocarbonsäuren ausgewählt sind aus Lysin, Ornithin, Hydroxylysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Phosphoserin und synthetischen trifunktionellen Aminocarbonsäuren. 65
21. Verbindung der allgemeinen Formel (I)  
 $Z_n-Y-X_m$



worin Z mindestens eine reaktive funktionelle Gruppe oder eine Bindegruppe bedeutet und, X mindestens eine reaktive funktionelle Gruppe ist, die an Z kovalent über einen Linker Y gebunden ist, wobei der Linker ein verzweigter Linker ist, der ein Molekulargewicht von 1000 Da aufweist und mindestens einen Ladungsträger oder/und mindestens eine hydrophile Gruppe enthält, n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und m 1 oder 2 ist.

22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie eines oder mehrere der Merkmale nach einem der Ansprüche 2 bis 20 aufweist.

23. Konjugat, umfassend mindestens eine biologische Substanz, an die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) nach Anspruch 21 oder 22 gekoppelt ist.

24. Konjugat nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Substanz ein Antikörper oder Antikörperfragment, eine Nukleinsäure, ein Polypeptidantigen, ein immunologisch reaktives Peptid oder ein Hapten ist.

25. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 21 oder 22 oder der Konjugate nach Anspruch 23 oder 24 in einem immunologischen Nachweisverfahren oder in einem Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren.

26. Verwendung nach Anspruch 25 in einem Lumineszenzverfahren.

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26 in einem Elektrochemilumineszenzverfahren.

28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Verbesserung der Löslichkeit von Markierungs- oder Effektorgruppen bzw. von deren Konjugaten.

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

---

Abb. 1

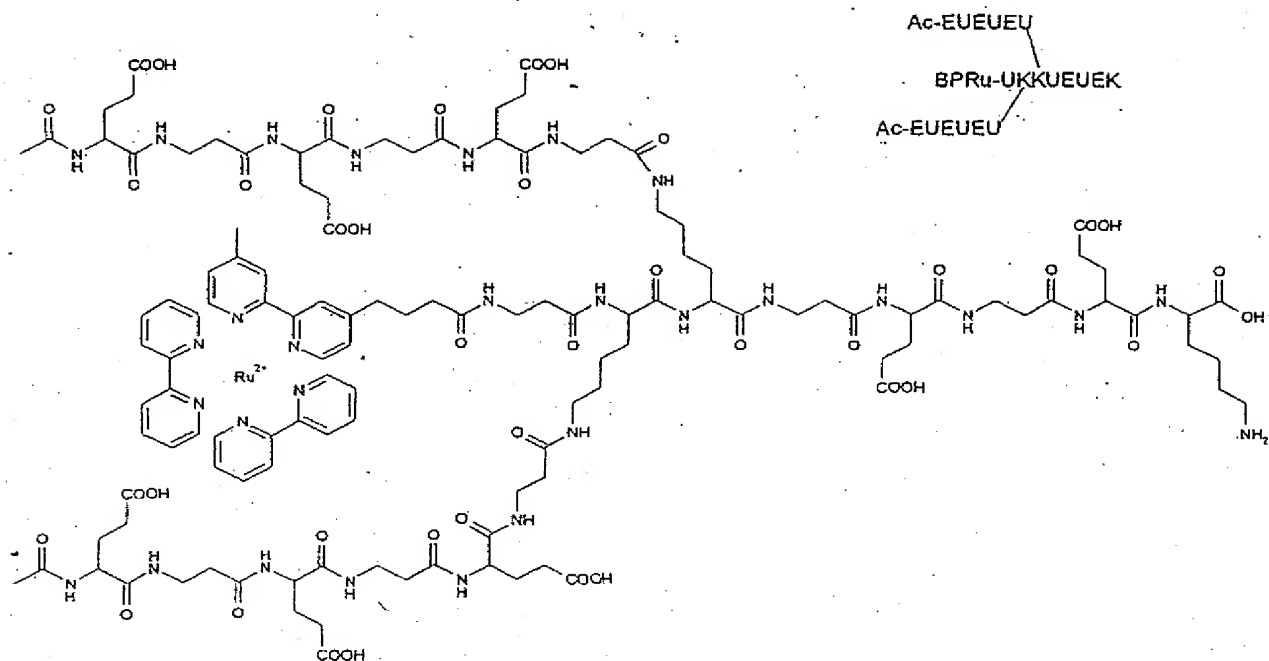


Abb. 2

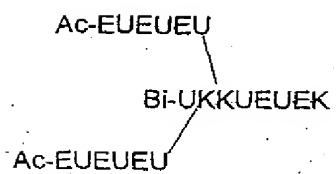


Abb. 3

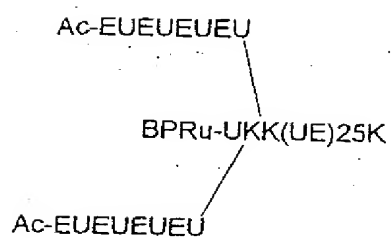


Abb. 4

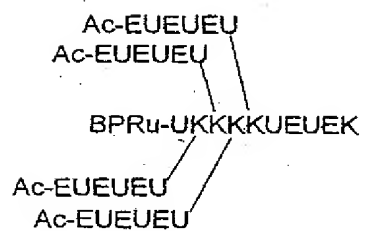


Abb. 5

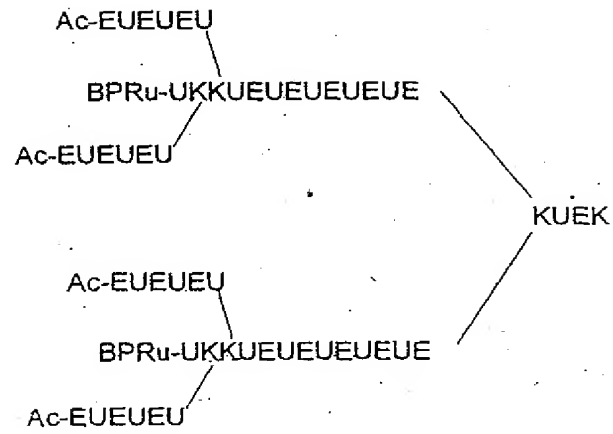


Abb. 6

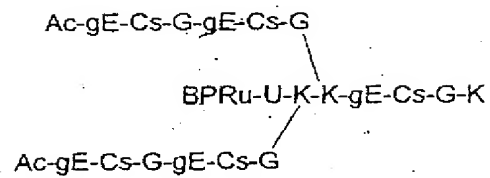


Abb. 7

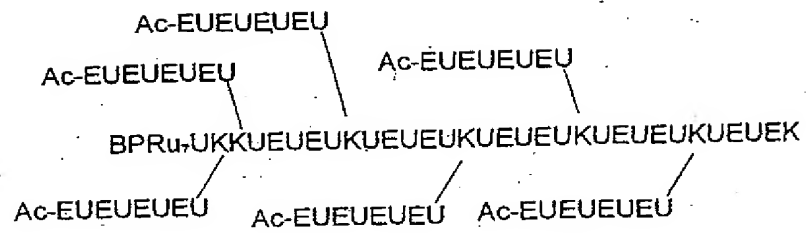


Abb. 8

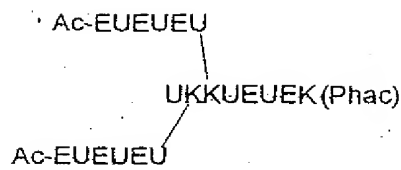


Abb. 9

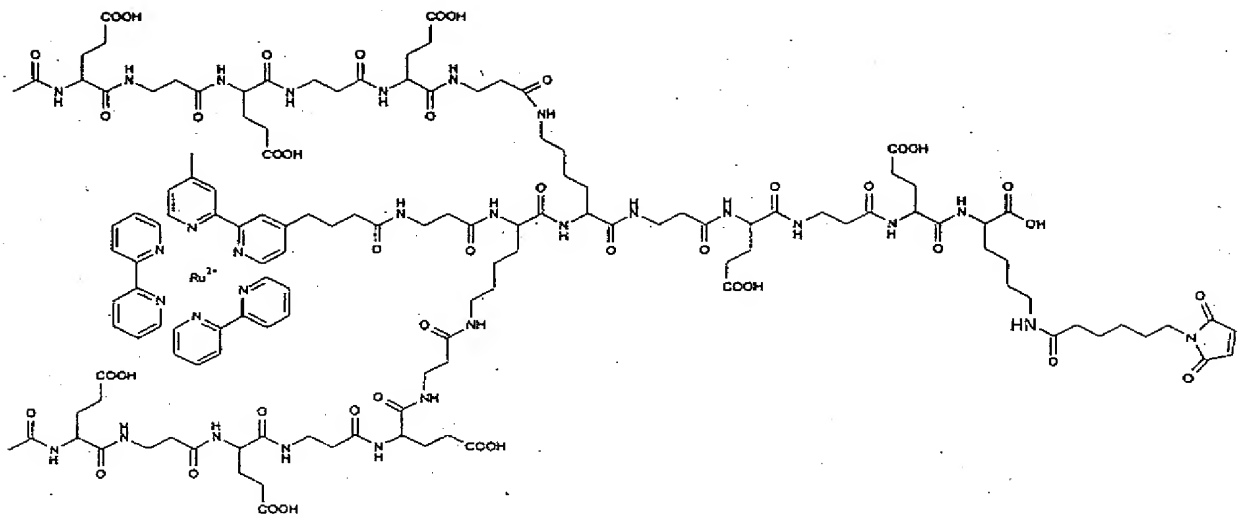
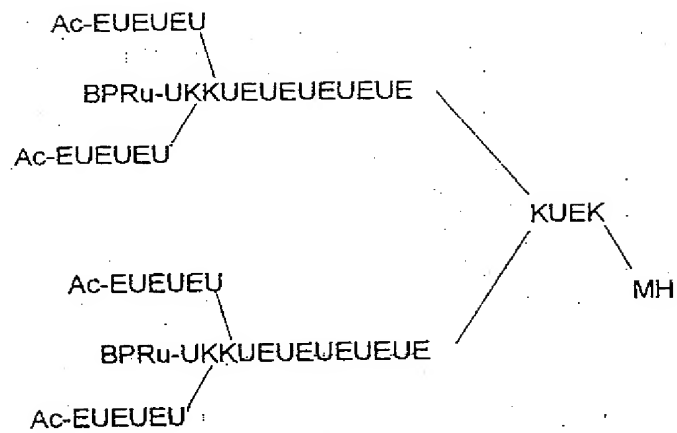


Abb. 10



ADD. 11

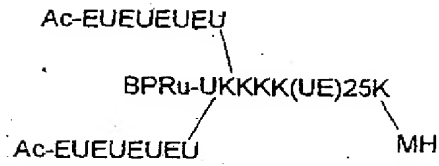


Abb. 12

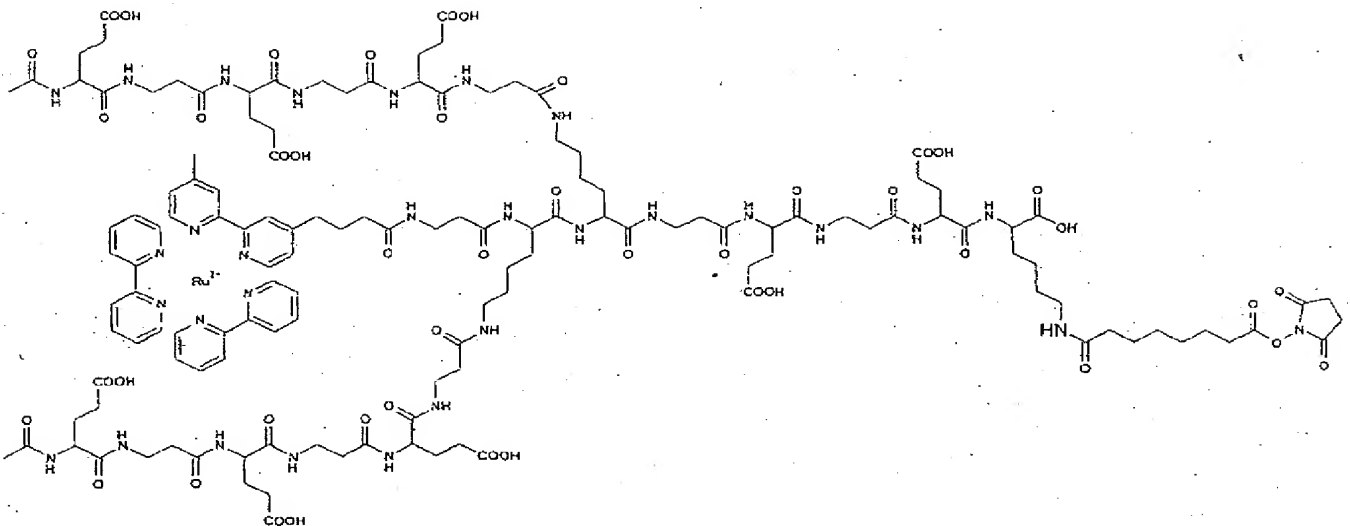


Abb. 13

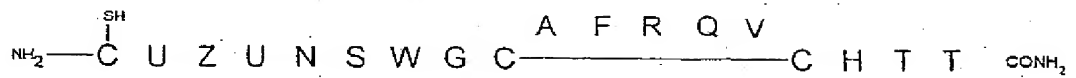




Abb. 14

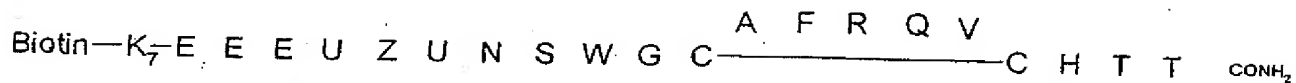


Abb. 15

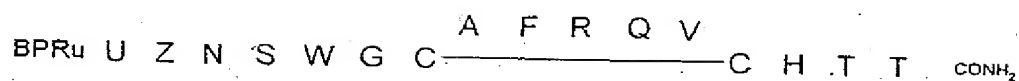


Abb. 16

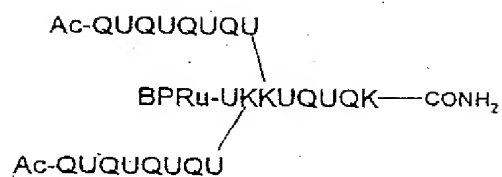


Abb. 17

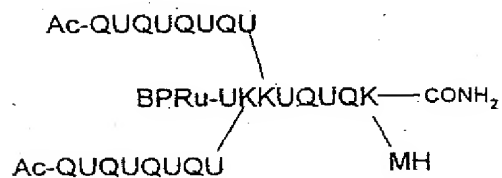


Abb. 18

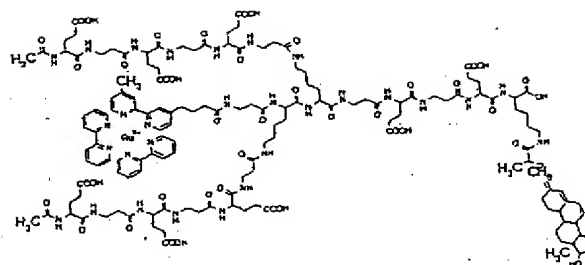


Abb. 19

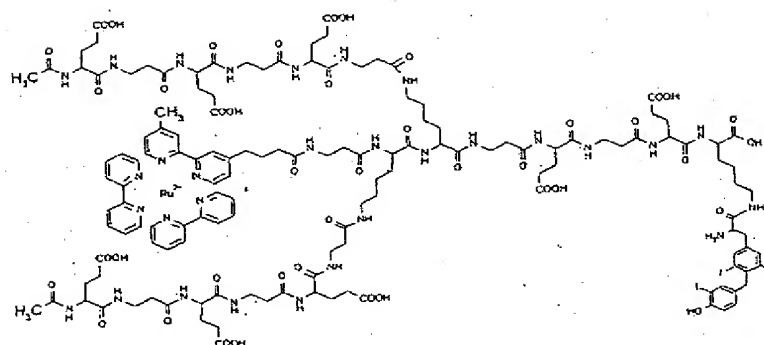


Abb. 20

